

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA**

**IMPLEMENTACION Y VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE
MICROSERONEUTRALIZACIÓN LIGADA A LA ENZIMA PEROXIDASA PARA
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA FIEBRE PORCINA CLÁSICA Y SU
COMPARACIÓN CON DOS PRUEBAS INMUNOENZIMÁTICA
(INMUNOPEROXIDASA Y ELISA)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: BILOGO
PRESENTA:**

MARGARITA ANDA VARGAS

ASESORES:

**MVZ. ANGEL MIRANDA SANCHEZ
MVZ. FELIPE DE LA O RAMIREZ**

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2003.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Virología del Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, perteneciente a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)

DEDICATORIA

A mis dos grandes tesoros Sergio y Diego
quienes fueron el motivo principal para concluir este proyecto.
Muchas gracias por su paciencia y comprensión.
Los amo con toda mi alma
Nunca lo olviden

A mi esposo
por su apoyo y paciencia

A mi padre Rafael Anda y a mi madre Margarita Vargas
Sin su amor y su apoyo no lo hubiera logrado, gracias por fortalecerme en los
momentos de desmayo
Papi donde quiera que estés mil gracias por tu enseñanza

A mis hermanos Paty, Gelis, Meche, Leti, Beto, Vero y en especial a Tere, por su
amor y apoyo incondicional.

A mi tía Lola por su amor y consejos.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores
MVZ Ángel Miranda y MVZ. Felipe de la O
por su amistad, tiempo y apoyo.

A mis Sinodales
por sus comentarios al presente trabajo y sus valiosas sugerencias.

A mis compañeras de trabajo
Rosy, Lidia y Elfida
por su amistad y apoyo incondicional.

A mis Jefes
MVZ. Marcela Mercado P. y MVZ. Jaime Robles G.

A mi gran amiga Teo
quien día con día me alentó en ésta tarea.

A mis compañeros
Juanita, Caty, Maribel, Cornelio
y especialmente a Martín, Raúl, Fernando, Leonardo, Joel y Mario
por su gran amistad y apoyo.

A mi gloriosa Facultad de Biología

C O N T E N I D O

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y METODOS	8
RESULTADOS	16
DISCUSION	26
CONCLUSIÓN	30
ANEXO	31
APENDICE	33
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	37

ABREVIATURAS

BIVE	Productora Nacional de Biológicos Veterinarios
CENASA	Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal
DICT	Dosis infectante en cultivo de tejidos
DO	Densidad óptica
FPC	Fiebre Porcina Clásica
MSLEP	Microseroneutralización ligada a la enzima peroxidasa
SAF	Solución Amortiguadora de Fosfatos
SCTIV	Seroneutralización en cultivo de tejidos
ST	Cultivo primario de testículo de cerdo
VDVB	Virus de la Diarrea Viral Bovina
VFPC	Virus de la Fiebre Porcina Clásica
VSV	Virus de Estomatitis Vesicular
% INH	Porcentaje de inhibición
Pk 15	Línea celular de riñón de cerdo

R E S U M E N

Una de las enfermedades virales de mayor importancia para la porcicultura nacional e internacional, es la Fiebre Porcina Clásica (FPC) por ser altamente contagiosa de rápida difusión y por ocasionar elevadas mortalidades, originando grandes pérdidas económicas y limitando el comercio de productos y subproductos.

Los primeros reportes de casos de FPC en México datan de 1876 y fueron atribuidos a la importación de ganado porcino de los Estados Unidos de América. Durante casi un siglo no se le dio mucha importancia a esta enfermedad y solo hasta 1973 se dieron las primeras acciones para controlar la enfermedad en el noroeste de México y a partir de 1980 se establece una Campaña Nacional para el control y erradicación de la FPC con carácter obligatorio y permanente. Una de las estrategias de esta campaña es la vigilancia epizootológica donde el diagnóstico de ésta enfermedad juega un papel importante.

En el presente trabajo se realizó la implementación y validación de la prueba de Microseroneutralización Ligada a la Enzima Peroxidasa (MSLEP) para la detección de anticuerpos contra Fiebre Porcina Clásica, en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), determinando la repetibilidad, sensibilidad y especificidad de la prueba y considerando como prueba de oro a la seroneutralización en cultivo de tejido (SCTIV). Además la MSLEP se comparó con la prueba de Inmunoperoxidasa y ELISA las cuales son técnicas empleadas para el diagnóstico serológico de ésta enfermedad.

Los resultados obtenidos muestran que la MSLEP presenta una repetibilidad del 93% con un coeficiente de variación de 6.5 %, una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%. Valores que pueden considerarse como satisfactorios.

Se determinó un nivel de concordancia del 0.96 con la prueba de Seroneutralización en Cultivo de Tejidos empleando el método de interferencia viral, la cual es considerada como la prueba de oro.

Al compararse la MSLEP con las pruebas de ELISA e Inmunoperoxidasa se obtuvo un nivel de concordancia del 0.88 y 0.95 respectivamente.

Analizando los resultados obtenidos en los ensayos la MSLEP puede considerarse como una prueba alternativa para la determinación de niveles de anticuerpos con Fiebre Porcina Clásica ya que presenta una alta sensibilidad, especificidad y repetibilidad.

INTRODUCCIÓN

La Fiebre Porcina Clásica (FPC) es una de las enfermedades en cerdos de mayor importancia en nuestro país, ya que las pérdidas económicas ocasionadas por ésta, son muy elevadas, debido a su rápida difusión, elevada mortalidad, abortos, gastos médicos y utilización de vacunas. Aunado a todo lo anterior se limita el comercio de cerdos, productos y subproductos a nivel nacional e internacional (9).

El agente causal de ésta enfermedad es un virus perteneciente al género Pestivirus de la familia *Flaviviridae*. (11). La partícula vírica presenta un diámetro de 40 a 50 nm con una nueclocápside de 29 nm. Su genoma viral está formado por una molécula de RNA de banda simple y polaridad positiva que presenta una longitud de 12,284 nucleótidos (2,2 Kb). El genoma viral actúa como ARN mensajero y se traduce en una poli proteína que procesada por la acción de proteasas virales, y de la célula huésped, para dar lugar a las proteínas maduras. El genoma ha sido clonado y secuenciado en su totalidad caracterizándose cuatro proteínas estructurales, la proteína p14, localizada en la nucleocápside y tres glicoproteínas: gp 55, también denominada (E1), gp 44, también conocida como E2 y gp 33. Las gp 55 y 44 están localizadas en la envoltura. Existe al menos una proteína no estructural denominada gp 2. La gp 55 induce anticuerpos neutralizantes y una gran variabilidad en una región lo que permite diferenciar distintas cepas virales (37, 44, 46).

El virus de la FPC (VFPC) se encuentra estrechamente relacionado, tanto antigénica como genéticamente con otros dos virus integrantes del mismo género de los pestivirus, el virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) y el de la Enfermedad de las fronteras (20, 24,25). Estos dos virus son patógenos para los rumiantes, aunque el VDVB puede también infectar el ganado porcino causando en algunas ocasiones infecciones con cuadro clínico y lesiones similares a la FPC.

La FPC es una enfermedad progresiva con un curso de 5-20 días. En la etapa inicial hay anorexia, fiebre superior a los 41°C, secreción ocular y conjuntivitis, estreñimiento que alterna con diarrea y vómito amarillento que se aprecia con frecuencia poco antes de que los animales mueran. Los signos clínicos y lesiones post-mortem de cerdos afectados con FPC son muy variables debido a la patogenicidad de las diferentes cepas del virus y a la susceptibilidad de los animales, por lo que el diagnóstico clínico es difícil ya que puede ser confundido con otras enfermedades como: la Peste Porcina Africana (enfermedad exótica para México), enfermedad de Aujeszky o Pseudorrabia, salmonelosis, erisipela, pasteurelisis, toxoplasmosis o intoxicación con sal (7).

El único huésped natural del virus de la FPC es el cerdo, tanto doméstico como silvestre, aunque el virus es capaz de replicarse en otras especies animales como rumiantes domésticos, venados y animales de experimentación, provocando una reacción febril, prácticamente asintomática.

El virus de FPC entra al organismo del animal por ingestión, inhalación, piel, o semen. Una vez en el animal, el virus se replica en tonsilas (infección oral o nasal) o en los nódulos linfáticos regionales. Tras una primera fase de replicación se produce una viremia (12 a 20 horas post infección hasta varias semanas). Tras esta fase, el virus se aloja en bazo, nódulos, riñón, pulmón y médula ósea, donde se producen nuevas replications víricas y las lesiones características de carácter hemorrágico.

El contacto directo entre animales infectados (en fase aguda ó portadores) y animales sanos es la forma más común de transmisión del VFPC. La eliminación del virus en animales infectados puede comenzar a partir del segundo día post infección por saliva, secreciones oculares y nasales. Después de unos días el virus se puede eliminar también por orina, heces y semen. Es importante, destacar la transmisión de madres portadoras inaparentes a sus lechones u otros animales adultos susceptibles.

La replicación del virus también se puede lograr "in vitro" utilizando cultivos primarios de células de riñón porcino, testículos de cerdo, células porcinas embrionarias, células de riñón de cobayo, zorro, conejo y ardilla entre otros. Además se replica en una gran variedad de líneas celulares establecidas de origen porcino, bovino, caprino, primate y cobayo. La de uso más frecuente en laboratorio es la línea de riñón de cerdo PK₋₁₅ (8).

La replicación del virus en las diferentes líneas celulares no produce efecto citopático en la célula infectada, por lo que para su detección es necesario emplear técnicas como la interferencia viral, Inmunofluorescencia o Inmunoperoxidasa.

El primer registro de ésta enfermedad se dio en los Estados Unidos de América en Indiana alrededor de 1830 y en Ohio en 1833 y se le denominó cólera porcino.

Los primeros reportes de casos de FPC en México datan de 1876 y fueron atribuidos a la importación de ganado porcino de los Estados Unidos de América (8)

En 1973 se dieron las primeras acciones para tratar de controlar ésta enfermedad en la zona noroeste de México, pero por acuerdo federal en 1980 se establece una Campaña para el Control y Erradicación de FPC en todo el país, con carácter obligatorio y permanente. (27).

Una pieza importante para lograr los objetivos de dicho programa es el diagnóstico veraz y oportuno de esta enfermedad utilizando pruebas altamente sensibles y específicas. El Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) de la Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), participa activamente en esta campaña realizando el diagnóstico de Fiebre Porcina Clásica.

El diagnóstico de FPC se realiza evidenciando el antígeno o los anticuerpos contra el virus. Para la detección del virus se emplean las técnicas de inmunofluorescencia directa, aislamiento viral en cultivo de tejido y ELISA; para el diagnóstico serológico se emplean las técnicas de inmunofluorescencia indirecta, inmunoperoxidasa, ELISA y seroneutralización en cultivo de tejidos utilizando el método de interferencia viral (SCTIV) (4,21).

En el presente trabajo solo se describen las pruebas aplicadas al diagnóstico serológico. La prueba de ELISA para la detección de anticuerpos es un método basado en una ELISA Competitiva en el que se utiliza un anticuerpo monoclonal frente a la gp 55 lo que permite además diferenciar los anticuerpos de VFPC de los de DVB. El suero problema se pone en contacto con la gp 55 y tras un periodo de incubación se pone la mezcla a competir con un monoclonal contra la gp 55. Este método permite la realización de un gran número de muestras gracias al sistema ELISA (todas las fases pueden ser automatizadas) en corto tiempo.

En la prueba de inmunoperoxidasa para detección de anticuerpos, se utiliza como marcador enzimático a la peroxidasa; se emplean líneas celulares infectadas con el virus de Fiebre Porcina Clásica, posteriormente se le añade el suero que se desea diagnosticar. Tras una serie de lavados para eliminar todo el anticuerpo que no se haya pegado a las proteínas del virus que están expresadas en la superficie celular, se añade un anticuerpo secundario o proteína G marcada, para posteriormente añadir un sustrato y un cromógeno de contraste del virus sobre una línea celular sensible.

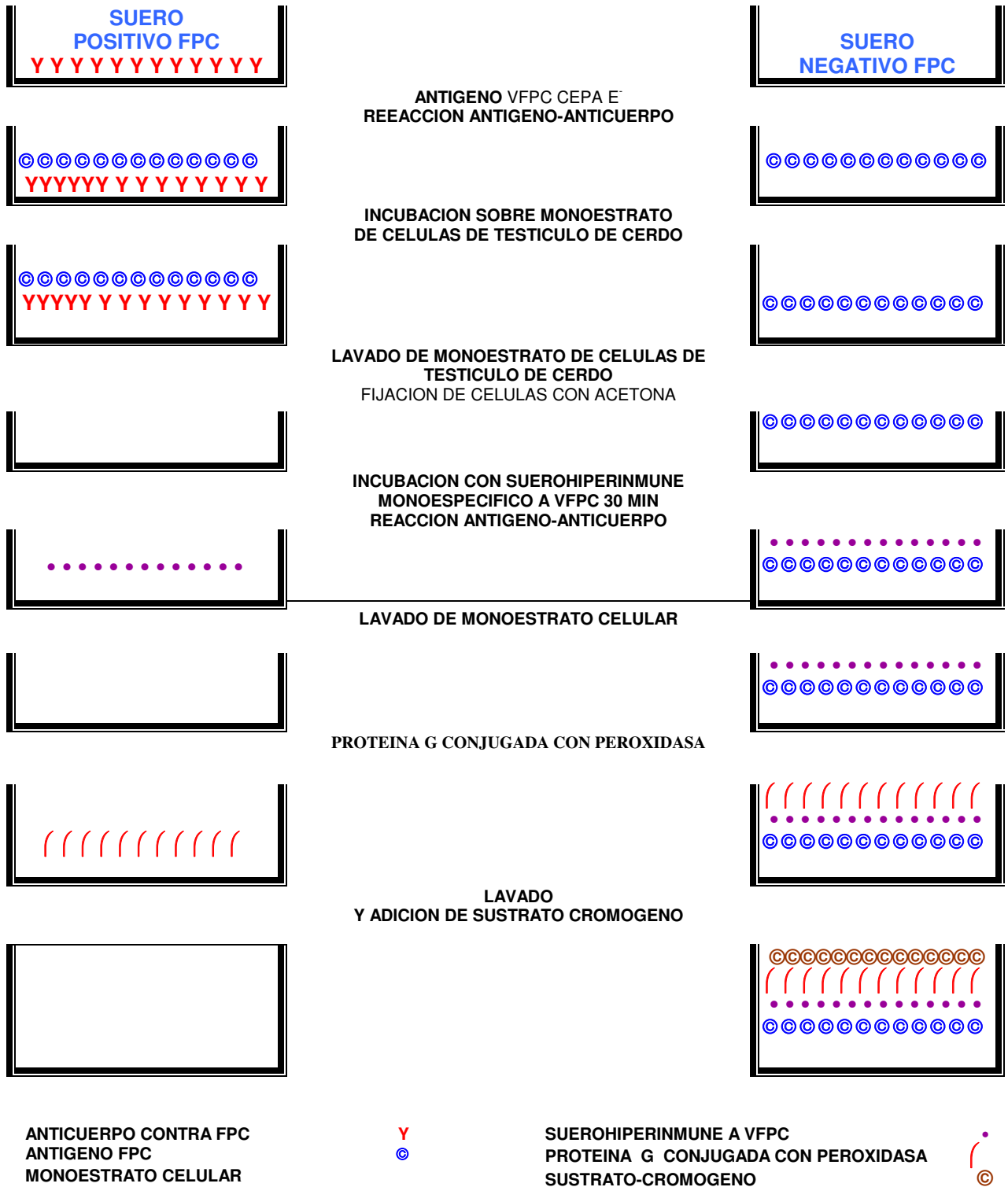
La técnica de Seroneutralización consiste en determinar la capacidad que tienen los anticuerpos presentes en el suero objeto de estudio de neutralizar el efecto de un virus sobre la línea celular. Se utilizan diferentes diluciones del suero problema y se comparan sus resultados frente a un suero control. Dado que el virus de Fiebre Porcina Clásica no produce efecto citopático, la posible acción del virus sobre la célula, se visualiza mediante fluorescencia indirecta, inmunoperoxidasa o por interferencia viral.

La técnica de Seroneutralización es laboriosa, requiere de cultivos celulares, esterilidad, además de ser generalmente lenta. Sin embargo es altamente específica y sensible y se considera la prueba de referencia para cualquier valoración serológica.

A la Seroneutralización en Cultivo de Tejidos por el método de Interferencia Viral (SCTIV) se le considera la prueba de oro (golden test), ya que nos determina el total de anticuerpos neutralizantes, es altamente sensible y específica (detecta hasta 50 pg de anticuerpos) (15). Este tipo de análisis es considerado como un método de referencia para cualquier estudio serológico pues es el que más se correlaciona entre la respuesta “ in vitro” y la respuesta “ in vivo”. En esta prueba se puede valorar la capacidad que tienen los anticuerpos presentes en un suero problema para neutralizar la actividad biológica del antígeno, pero el periodo para la emisión de un resultado diagnóstico empleando ésta es de aproximadamente 7-9 días, además el uso de cultivos celulares primarios, medios de cultivo, reactivos, biológicos, material, equipo y horas hombres es muy elevado (Tabla No. 10).

Considerando lo anterior y exigencias de la propia campaña, se requiere de una técnica alternativa que determine el total de anticuerpos neutralizantes en un periodo más breve y que sus índices de sensibilidad y especificidad sean altos. La microseroneutralización Ligada a la Enzima Peroxidasa (MSLEP) se propone como una alternativa. La MSLEP utiliza una línea celular a diferencia de la SCTIV que emplea cultivo celular primario. Es una técnica inmunoenzimática que permite determinar la concentración de anticuerpos neutralizantes mediante la detección del complejo antígeno-anticuerpo utilizando un trazador enzimático (proteína G conjugada con la enzima peroxidasa). Por ejemplo, se tiene una muestra de suero con anticuerpos específicos a VFPC, al estar en contacto con un virus homólogo, se llevará a cabo la reacción antígeno-anticuerpo. Si estos son inoculados en cultivos celulares, las células no se afectaran ya que el virus queda neutralizado por los anticuerpos específicos. Posteriormente se adiciona a estos cultivos celulares un suero hiperimmune monoespecífico a VFPC. Como el virus no se replicó en las células debido a que quedó neutralizado, al adicionar la proteína G conjugada con la peroxidasa, no encontrará la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas de tipo G para unirse y por consiguiente no habrá reacción de color producido por la enzima al ser desdoblada por el sustrato. En caso contrario si una muestra de suero no presenta anticuerpos específicos contra VFPC al estar frente a un virus homólogo no habrá reacción antígeno-anticuerpo. Quedando el virus libre y al ser inoculado sobre células serán infectadas por el virus libre y al adicionar el suero monoespecífico sobre los monoestratos celulares los anticuerpos se unirán al antígeno en las células produciendo una reacción antígeno-anticuerpo, aquí la proteína G si encontrará sitios de unión haciéndose evidente por la reacción de color al ser adicionado el sustrato (ver figura No. 1)

FIGURA NO. 1 MICROSERONEUTRALIZACION LIGADA A LA ENZIMA PEROXIDASA



OBJETIVO GENERAL:

Implementación y validación de la técnica de Microseroneutralización Ligada a la Enzima Peroxidasa, para detección de anticuerpo contra el virus de la enfermedad de Fiebre Porcina Clásica.

OBJETIVO PARTICULAR:

Optimizar tiempo, material, biológicos, reactivos y personal, para el diagnóstico serológico de la Fiebre Porcina Clásica.

Detección de anticuerpos específicos contra Fiebre Porcina Clásica, diferenciándolos de los de Diarrea Viral Bovina.

Implementación de ésta técnica para otros diagnósticos serológicos de enfermedades virales en animales.

METODOLOGÍA

Para realizar la implementación y validación de la prueba de Microseroneutralización Ligada a la Enzima Peroxidasa (MSLEP), se determinó la repetibilidad, sensibilidad y especificidad de la prueba, empleando la prueba de Seroneutralización en cultivo de tejido por el método de Interferencia Viral como prueba de oro.

Para la determinación de la repetibilidad, se tomaron al azar 10 sueros sanguíneos de cerdos, los cuales fueron identificados como muestras piloto. A este grupo se les practicó tres veces la prueba de MSLEP, para posteriormente determinar el coeficiente de variación (desviación standard de las repeticiones / media de las repeticiones x 100)

Para establecer la sensibilidad y especificidad de la prueba MSLEP se trabajaron 80 sueros sanguíneos de cerdo considerando a la prueba de seroneutralización en cultivo de tejido por el método de interferencia viral (SCTIV) como prueba de oro y empleando una tabla de 2X2.

Posteriormente se realizó la comparación de la MSLEP con dos pruebas inmunoenzimáticas (Inmunoperoxidasa y ELISA), utilizando un segundo grupo de 80 sueros y empleando la estadística de Kappa para determinar su concordancia.

Fig. No. 3 Diseño experimental

PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA DE MICROSERONEUTRALIZACION LIGADA A LA ENZIMA PEROXIDASA (MSLEP)

La microseroneutralización ligada a la enzima peroxidasa, está basada en la técnica descrita por Holm Jensen (1981) y Terspstra (1984) con algunas modificaciones empleando la línea celular de testículo de cerdo (ST) y proteína G (Componente de la pared celular de *Escherichia coli*, la cual actúa como receptor natural para los anticuerpos y tiene apetencia por la fracción cristalizable de la inmunoglobulina IgG de cerdo y otras especies), conjugada con peroxidasa en lugar de la línea PK15 y un anti-IgG de cerdo conjugado con Peroxidasa.

- c. En microplacas de fondo plano de 96 pozos, se colocaron 100 µl de una suspensión de línea celular de testículo de cerdo (ST) a una concentración de 2×10^5 cel/ml, y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 70 % de humedad, hasta que se observó una confluencia celular del 70 al 80% (generalmente 24 hrs. posteriores a la siembra)
- d. Los sueros sanguíneos de cerdo se inactivaron a 56°C durante 30 minutos
- e. Se realizaron diluciones dobles de los 80 sueros problemas (iniciando con una dilución 1:2 hasta 1:2048) utilizando medio de dilución (Medio mínimo esencial Eagle conteniendo L-glutamina solución stock al 1%, sol. stock penicilina-estreptomicina 2%, Sol. stock Bicarbonato de sodio 2%, ver apéndice II) en un volumen de 100 microlitros en microplacas de 96 pozos fondo plano. El mismo procedimiento se realizó para los sueros que se emplearon como control positivo y control negativo (elaborados en el CENASA).
- f. Para confirmar el título del suero hiperinmune monoespecífico a VFPC se realizaron diluciones decimales de 10⁰ a 10⁻³.
- g. Se adicionaron 100 microlitros de una suspensión de virus de FPC cepa E⁻ conteniendo 200 DICT_{50%}/ 0.1 ml, dentro de cada pozo donde se realizaron las diluciones de los 80 sueros problemas, sueros de referencia y suero hiperinmune, utilizando medio de dilución. Se agitaron las microplacas y se incubaron a 37°C durante 1 hora para permitir la reacción antígeno-anticuerpo.

- h. Se realizaron diluciones decimales del virus E⁻ de 10^0 a 10^{-3} y se incubaron a 37°C durante una hora, para corroborar las 200 DICT_{50%}/ 0.1 ml que deben emplearse en la prueba.
- i. Posteriormente a las microplacas que contenían el monoestrato celular ST se les descartó el medio.
- j. Por cada dilución de los sueros problemas y de referencia, se inoculó un pozo con 100 microlitros. De las diluciones del antígeno y del suero hiperinmune se inocularon 4 pozos por cada dilución y se incubaron a 37°C en una estufa con una atmósfera del 5% de CO₂ y 70% de humedad durante 48-72 hrs.
- k. Después de éste período se descartaron los inóculos de las microplacas y se lavaron con **SAF-L (Solución amortiguadora de fosfatos SAF 0.01 M - pH. 7.2-7.4 más 5 ml de tween 20) tres veces. Posteriormente se invirtieron las microplacas sobre una toalla de papel absorbente para eliminar completamente la solución de lavado.
- l. Para fijar las células de las microplacas se adicionaron 100 microlitros de acetona al 30% (700 ml de SAF, 300 ml de acetona y 0.2 grs. de albúmina sérica bovina) a cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se descartó la acetona de las microplacas y se dejaron secar a 37°C durante 2 horas. NOTA: cuando las placas no se trabajaron inmediatamente se almacenaron a -20°C.
- m. Posteriormente se adicionó a cada pozo 50 microlitros de suero hiperinmune de FPC(Elaborado en el CENASA en especie homóloga) con título 1: 300 –1:500 y se incubaron durante 30 minutos a 37°C (18)
- n. Se lavaron las microplacas de 3 a 5 veces con SL
- o. Se adicionó a cada pozo 50 microlitros de *proteína G conjugada con peroxidasa*(Cat. P-8170 dilución 1/500) y se incubaron a 37°C durante 15 minutos.
- p. Nuevamente se lavaron las microplacas de 3-5 veces con SAF-L y se invirtieron las microplacas sobre una toalla absorbente.

* DICT dosis infectante en cultivo de tejidos

- q. Se adicionaron 50 microlitros de *sustrato-cromógeno (Solución A: 28.4 grs. de Fosfato de sodio, 1 ml de timerosal al 11% en 1000 ml de agua destilada. Solución B: Ácido cítrico 19.2 g en 1000 ml de agua destilada. Indicador de peroxidasa: 3 Amino-9 etil-carbazol 5 grs., alcohol etílico 25 ml y tween 20 - 75ml. Sustrato cromógeno para 5 microplacas: Solución A: 15ml + Solución B 15 ml + Sustrato H₂ O₂ : 20 microlitros + 0.2 ml de indicador de peroxidasa, ver apéndice III) dentro de cada pozo y se incubaron 15-30 minutos a temperatura ambiente.
- r. La lectura se realizó visualmente o con la ayuda de un microscopio óptico.
- s. Los niveles de anticuerpos se determinaron considerando la última dilución donde no se presentó coloración.
- t. Se consideraron sueros positivos aquellos que mostraron un título mayor a 1:4

** Kit Diagnóstico para FPC por inmunoperoxidasa, comercializado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (BIVE), Zaragoza No. 75, Col. Lomas Altas 11950 México, DF.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN EN CULTIVO PRIMARIO DE TESTICULO DE CERDO EMPLEANDO EL MÉTODO DE INTERFERENCIA VIRAL (SCTIV) PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA VFPC PRUEBA DE ORO

- u. Se inactivaron los sueros a 56 °C durante 30 minutos.
- v. En microplacas de 96 pozos con fondo plano, se realizaron diluciones dobles de los sueros problemas y sueros control positivo y negativo (elaborados en el CENASA), iniciando con la dilución 1:2 hasta 1:2048, empleando medio de dilución (Medio mínimo esencial Eagle conteniendo L-glutamina solución stock al 1%, sol. stock penicilina-estreptomicina 2%, Sol. stock Bicarbonato de sodio 2%, ver apéndice II) en un volumen de 100 microlitros.
- w. Se adicionaron 100 microlitros de suspensión viral de FPC cepa E⁻ conteniendo 200 *DICT_{50%}/0.1 ml dentro de cada dilución y se incubaron a 37 °C durante una hora.
- x. Posterior a la incubación se inoculan 0.1 ml de cada dilución dentro de tubos para cultivo celular (previamente identificados) y se adicionaron 0.5 ml de una suspensión celular de cultivo primario de testículos de cerdo a una concentración de 2.5×10^6 /ml, y se incubaron por un período de cinco días a 37°C.
- y. Terminado éste periodo se descartó el medio de los tubos y se procedió a desafiar con el Virus de Estomatitis Vesicular (VSV), para esto se adicionaron a cada tubo 0.5 ml de VSV conteniendo 200 DICT_{50%}/ml, empleando medio de dilución y se incubó por un período de 48 hrs. en sistema rotatorio.
- z. Posterior a este periodo se procedió a realizar la lectura.
- aa. Se consideraron sueros positivos aquellos en donde se presentó efecto citopático y el titulo de anticuerpos se determinó en la dilución más alta donde se evidenció este efecto. Los monoestratos que no mostraron efecto citopático se consideraron como negativos.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA PARA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA VFPC

Se utilizó un Kit comercial para diagnóstico para FPC por inmunoperoxidasa (*Kit Diagnóstico para FPC por inmunoperoxidasa, comercializado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (BIVE)).

- bb. Las microplacas de éste kit contienen células de líneas ST. Las columnas de pozos 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11 y 12 contienen células infectadas con virus de FPC (pozos sensibilizados) y las columnas de pozos 1, 4, 7 y 10 contienen células no infectadas con el virus de FPC y se mantuvieron a menos 20°C hasta su uso.
- cc. Se realizaron diluciones 1: 4 de los 80 sueros problemas y sueros control negativo y positivo, adicionando 50 microlitros de suero problemas más 150 microlitros de *SAF "D" (Cloruro de Sodio 21grs.+ .745 grs. Fosfato de Sodio Monobásico 1.38 grs. + Fosfato de sodio dibásico 1.741 grs. + tween 20 0.25 ml en 1 litro de agua destilada) en una microplaca de 96 pozos, fondo plano y distribuyéndolos por columnas.
- dd. Las *microplacas (kit diagnóstico), se descongelaron a medio ambiente durante 15 minutos.
- ee. Posteriormente estas microplacas se lavaron adicionando a todos los pozos 100 microlitros de *SAF-L (Solución amortiguadora de fosfatos SAF 0.01 M pH. 7.2-7.4 más 5 ml de tween 20). La solución se añade lentamente para evitar el desprendimiento de la monocapa celular y se mantuvieron así durante 5 minutos, para posteriormente eliminar gentilmente la solución de lavado y se secaron perfectamente con papel absorbente.
- ff. Utilizando una multipipeta de 8 canales, se transfirieron los sueros diluidos 1:4 de la columna 1 de la microplaca a las columnas 1, 2, 3 de la microplaca del kit diagnóstico. (El volumen para cada pozo será de 50 microlitros), y se incubaron por un período de 30 minutos a 37 grados centígrados.

* Kit Diagnóstico para FPC por inmunoperoxidasa, comercializado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (BIVE), Zaragoza No. 75, Col. Lomas Altas 11950 México, DF.

- gg. Posterior a este periodo se descartaron los inóculos y se lavaron las microplacas como se indica en el paso 5.
- hh. Se adicionó 50 microlitros de *proteína G conjugada con peroxidasa* (Cat. P-8170 dilución 1/500) dentro de cada pozo y se incubaron a 37°C en cámara húmeda durante 30 minutos.
- ii. Se realizó el procedimiento del paso 7.
- jj. Se adicionaron 50 microlitros de* sustrato-cromógeno (Solución A: 28.4 grs. de Fosfato de sodio, 1 ml de timerosal al 11% en 1000 ml de agua destilada. Solución B: Ácido cítrico 19.2 g en 1000 ml de agua destilada. Indicador de peroxidasa: 3 Amino-9 etil-carbazol 5 grs., alcohol etílico 25 ml y tween 20 - 75ml. Sustrato cromógeno para 5 microplacas: Solución A: 15ml + Solución B 15 ml + Sustrato H₂ O₂ : 20 microlitros + 0.2 ml de indicador de peroxidasa, ver apéndice III) dentro de cada pozo y se incubaron 15-30 minutos a temperatura ambiente.
- kk. Se eliminaron gentilmente los inóculos, se lavaron las microplacas y se invirtieron las microplacas para eliminar los residuos utilizando un papel absorbente.
- ll. Se procedió a realizar la lectura utilizando un microscopio con luz invertida o un microscopio óptico.
- mm. Se consideraron como sueros positivos aquellos en que los dos pozos sensibilizados se observaron citoplasmas teñidos de color rojizo-café y en el pozo no sensibilizado no se observó coloración.
- nn. Se consideraron como sueros negativos aquellos en los que los pozos sensibilizados y el pozo no sensibilizado no presentaron coloración en el citoplasma.

* Kit Diagnóstico para FPC por inmunoperoxidasa, comercializado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (BIVE), Zaragoza No. 75, Col. Lomas Altas 11950 México, DF.

PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA DE INMUNO ENZAYO LIGADO ENZIMA (ELISA) PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA VFPC

Para la realización de ésta técnica se utilizó el *kit comercial de ELISA para diagnóstico de FPC, disponible en el CENASA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La ELISA de competición CTB (Complex-Trapping-Blocking) es una ELISA de captura-competitiva que emplea dos anticuerpos monoclonales específicos frente a dos epítopes diferentes de la proteína estructural E2, uno de ellos tapizando las placas (captura) y el otro conjugado con peroxidasa (detector). Como antígeno utiliza una proteína recombinante obtenida mediante baculovirus en cultivos de células de insecto.

Interpretación de los resultados de la prueba de ELISA:

Los sueros que mostraron un porcentaje de inhibición entre 0 – 30 se consideraron negativos a la presencia de anticuerpos de FPC, valores entre 31 – 50 % de inhibición se consideraron sospechosos y valores entre 51-100% de inhibición se consideraron positivos.

*Complex Trapping ELISA (CTB) Dr. Terpstra, Central Veterinary Institute. P:O: Box365,8200 AJ Lelystad, The Netherlands

R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos en los 10 sueros identificados como muestras pilotos para determinar la repetibilidad de la prueba de Microseroneutralización Ligada a la Enzima Peroxidas (MSLEP) se describen en la Tabla No. 1, en donde se obtuvieron 7 sueros positivos y 3 sueros negativos a la presencia de anticuerpos contra el virus de la Fiebre Porcina Clásica. En las tres repeticiones de la prueba se mantuvieron la misma serología positiva y negativa (Figura No. 2) y solo se presentaron variaciones en cuanto al título de anticuerpo cuya desviación estándar osciló entre 0 y 1. Se determinó el coeficiente de variación de todos los sueros encontrándose un valor de 6.5%.

TABLA NO. 1 RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE REPETIBILIDAD PARA LA MICROSERONEUTRALIZACION LIGADA A LA ENZIMA PEROXIDASA

SUERO	1ª. PRUEBA TITULO DE ANTICUERPOS EXPRESADOS EN LOG. BASE 2	2ª. PRUEBA TITULO DE ANTICUERPOS EXPRESADOS EN LOG. BASE 2	3ª. PRUEBA TITULO DE ANTICUERPOS EXPRESADOS EN LOG. BASE 2	PRO MEDIO LOG BASE 2	DES VIACIÓN ESTAN DAR	COEFI CIENTE DE VARIA CION (%)
1	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁶	6.6	0.57	8.6
2	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁸	8.6	0.57	6.6
3	2 ⁷	2 ⁶	2 ⁷	6.6	0.57	8.6
4	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁷	7.6	0.57	7.5
5	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0
6	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0
7	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁵	4.6	0.57	12.3
8	2 ⁸	2 ⁶	2 ⁷	7.0	1	14.2
9	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁷	7.3	0.57	7.8
10	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0
PROMEDIO						6.5

FIG.NO 2 PRUEBA DE REPETIBILIDAD PARA LA MSLEP

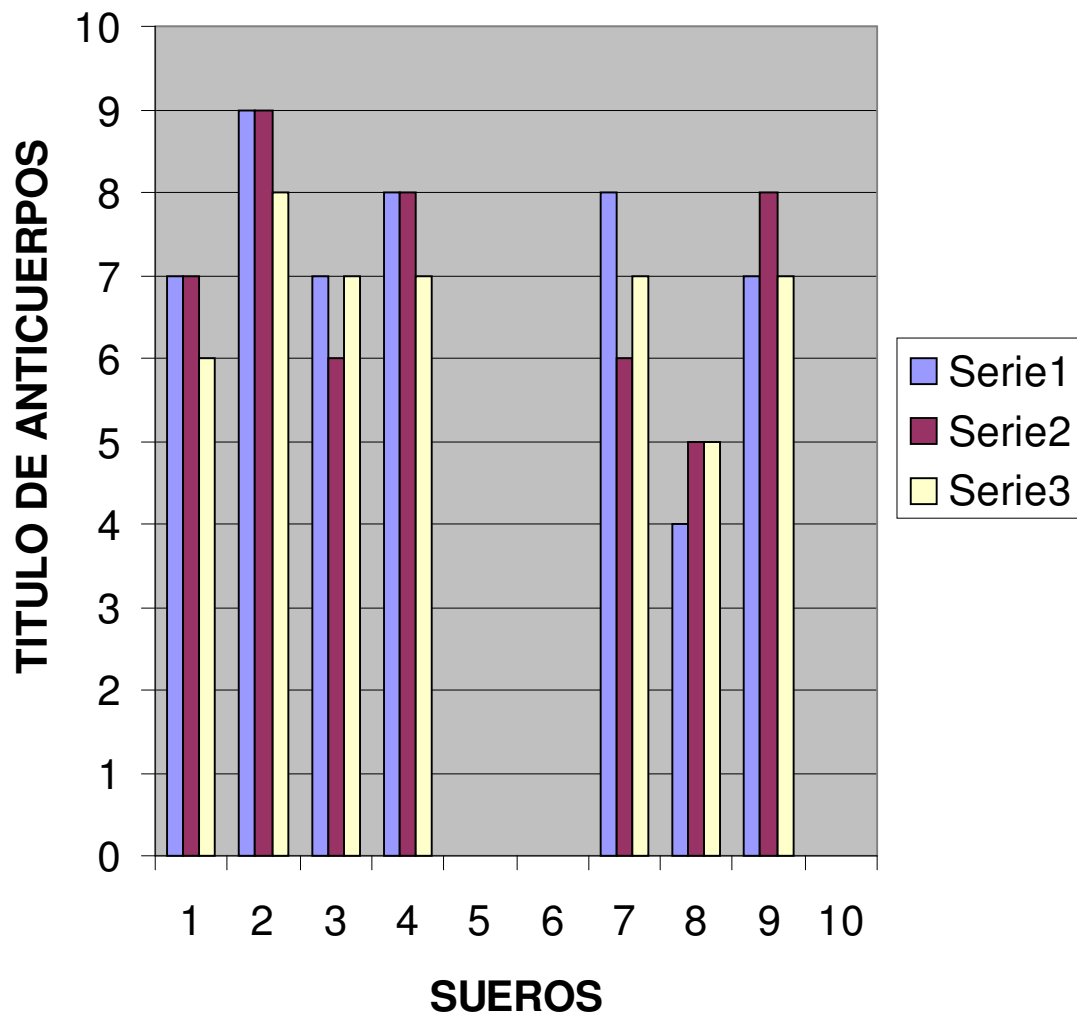


TABLA NO. 2 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE SERONEUTRALIZACION EN CULTIVO DE TEJIDOS Y LA MICROSERONEUTRALIZACION LIGADA A LA ENZIMA PEROXIDASA

IDENTIFICACIÓN SUERO	SCTIV TA	MSLEP TA	IDENTIFICACIÓN DEL SUERO	SCTIV TA	MSLEP TA
1	2 ¹¹	2 ¹⁰	41	Negativo	Negativo
2	2 ⁷	2 ⁵	42	2 ⁹	2 ⁹
3	2 ⁹	2 ⁸	43	2 ⁹	2 ⁸
4	2 ⁷	2 ⁷	44	2 ⁹	2 ⁸
5	2 ⁸	2 ⁷	45	2 ⁸	2 ⁸
6	2 ¹⁰	2 ⁹	46	2 ¹⁰	2 ⁹
7	2 ⁸	2 ⁸	47	2 ⁹	2 ¹¹
8	2 ⁹	2 ¹⁰	48	2 ⁸	2 ⁹
9	2 ⁸	2 ⁷	49	2 ¹⁰	2 ¹⁰
10	2 ¹⁰	2 ⁸	50	2 ⁹	2 ¹¹
11	2 ⁹	2 ⁷	51	2 ⁷	2 ⁸
12	2 ⁸	2 ⁷	52	2 ¹⁰	2 ¹⁰
13	2 ⁸	2 ⁶	53	2 ¹⁰	2 ¹¹
14	2 ¹¹	2 ¹¹	54	2 ⁸	2 ¹⁰
15	2 ⁷	2 ⁵	55	2 ⁸	2 ⁹
16	2 ¹⁰	2 ⁸	56	2 ⁸	2 ⁷
17	2 ⁸	2 ⁵	57	2 ⁸	2 ⁷
18	2 ⁹	2 ⁷	58	2 ⁹	2 ¹⁰
19	2 ⁸	2 ⁸	59	2 ⁸	2 ⁹
20	2 ⁷	2 ⁷	60	2 ¹¹	2 ¹¹
21	2 ⁷	2 ⁸	61	2 ¹⁰	2 ¹⁰
22	2 ²	Negativo	62	2 ¹⁰	2 ¹¹
23	2 ⁹	2 ⁹	63	2 ⁷	2 ⁸
24	2 ⁸	2 ⁸	64	2 ⁸	2 ¹⁰
25	2 ⁷	2 ⁸	65	2 ⁸	2 ⁹
26	2 ⁸	2 ⁸	66	2 ¹⁰	2 ¹¹
27	2 ⁷	2 ⁸	67	2 ⁸	2 ¹⁰
28	2 ⁷	2 ⁷	68	2 ⁹	2 ¹⁰
29	2 ³	2 ²	69	2 ¹⁰	2 ¹⁰
30	Negativo	Negativo	70	2 ⁹	2 ¹¹
31	Negativo	Negativo	71	2 ⁹	2 ⁹
32	Negativo	Negativo	72	Negativo	Negativo
33	Negativo	Negativo	73	Negativo	Negativo
34	Negativo	Negativo	74	2 ²	Negativo
35	Negativo	Negativo	75	Negativo	Negativo
36	Negativo	Negativo	76	Negativo	Negativo
37	Negativo	Negativo	77	Negativo	Negativo
38	Negativo	Negativo	78	Negativo	Negativo
39	Negativo	Negativo	79	Negativo	Negativo
40	Negativo	Negativo	80	Negativo	Negativo

TA: Título de anticuerpos.

Los resultados obtenidos en los sueros que se analizaron por la prueba de MSLEP y SCTIV, se registraron en la Tabla No. 2 y fueron expresados en logaritmo base 2.

En la prueba de MSLEP se obtuvieron 22 sueros negativos a la presencia de anticuerpos contra el VFPC y 58 sueros positivos a la presencia de anticuerpos contra el VFPC (1 suero con título de 2^2 , 3 sueros con un título 2^5 , 1 suero con un título de 2^6 , 10 sueros con un título 2^7 , 15 sueros con un título de 2^8 , 9 sueros con un título de 2^9 , 11 sueros con un título de 2^{10} y 8 sueros con un título de 2^{11}).

En la prueba de SCTIV se obtuvieron 20 sueros negativos y 60 sueros positivos a la presencia de anticuerpos contra el VFPC (2 sueros con título de 2^2 , 1 suero con un título 2^3 , 10 sueros con un título de 2^7 , 19 sueros con un título 2^8 , 14 sueros con un título de 2^9 , 11 sueros con un título de 2^{10} , 3 sueros con un título de 2^{11}).

Considerando los datos anteriores se estableció una tabla de 2 x 2 para determinar sensibilidad y especificidad de la prueba, los cuales se describen en la tabla No. 3 y en donde se obtuvo una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%, al considerar un suero falso negativo ya que en la prueba de oro se registró un título de anticuerpos de 2^2 . El valor predictivo positivo fue del 100% y el valor predictivo negativo del 95 %

TABLA NO. 3 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE MICROSERONEUTRALIZACION LIGADA A LA ENZIMA PEROXIDASA ESTABLECIENDO UNA TABLA DE 2X2

	M S L P		
	POSITIVOS	NEGATIVOS	
SNCT			
POSITIVOS	57 (A)	0(B)	57 (A+B)
NEGATIVOS	1(C)	22(D)	23(C+D)
TOTALES	58 (A+C)	22(B+D)	80(TOTAL)

SENSIBILIDAD:	$(A / (A+C)) \times 100$ $57 / 58 \times 100 = 98\%$	VALOR PREDICTIVO POSITIVO	$A/A + B \times 100$ $57 / 57 \times 100$ 100%
ESPECIFICIDAD	$(D / (D+B)) \times 100$ $22 / 22 \times 100 = 100\%$	VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	$D/ C + D \times 100$ $22 / 23 \times 100$ 95%

En donde:

A = Verdaderos positivos
C = Falsos Negativos

B = Falsos positivos
D = Verdaderos Negativos

Al realizar la prueba estadística de Kappa se obtuvo una concordancia de 0.95 entre la prueba de MSLEP y la SCTIV (prueba de oro) .al registrarse el 98% de acuerdos encontrados y un 59% de acuerdos al azar (Tabla No. 4)

TABLA NO. 4 PRUEBA DE KAPPA PARA ESTABLECER LA CONCORDANCIA ENTRA LAS PRUEBAS DE SERONEUTRALIZACION EN CULTIVO DE TEJIDOS (PBA DE ORO) Y LA PRUEBA DE MICROSERONEUTRALIZACION LIGADA A LA ENZIMA INMUNOPEROXIDASA

	M S L P	
	POSITIVOS	NEGATIVOS
SNCT		
POSITIVOS	Acuerdos por azar positivos $57 \times 58 / 80 = 41.3$	
NEGATIVOS		Acuerdos por azar negativos $23 \times 22 / 80 = 6.3$
TOTALES		

$$\text{Kappa} = \frac{\text{No. De acuerdos encontrados} - \text{No. De acuerdos por azar}}{100\% - \text{No. De acuerdos por azar}}$$

En donde:

$$\text{No. De Acuerdos encontrados} = \frac{A + D}{A + B + C + D}$$

$$\text{No del Acuerdos al azar} = \frac{\text{encontrados en A} + \text{encontrados en D}}{A + B + C + D}$$

$$\text{Encontrados en A} = \frac{(A + B)}{A + B + C + D} \times \frac{(A + C)}{A + B + C + D}$$

$$\text{Encontrados en D} = \frac{(C + D)}{A + B + C + D} \times \frac{(B + D)}{A + B + C + D}$$

$$\text{Kappa} = \frac{98\% - 59\%}{100 - 59\%} = \frac{39\%}{41\%} = 0.95 \text{ De concordancia.}$$

TABLA NO. 5 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE MICROSERONEUTRALIZACION LIGADA A LA ENZIMA PEROXIDASA ELISA E INMUNOPEROXIDASA

No.	MSLP TA	PEROXI DASA	ELISA			No.	MSLP TA	PERO XIDASA	ELISA		
				DO ₄₅₀	%INH					DO ₄₅₀	%INH
1	2 ⁹	+	+	0.205	92.073	41	2 ⁸	+	+	0.212	84.068
2	2 ¹¹	+	+	0.150	94.200	42	2 ⁹	+	+	0.202	91.995
3	2 ¹⁰	+	+	0.179	93.078	43	2 ⁸	+	+	0.204	91.802
4	2 ¹⁰	+	+	0.143	94.470	44	2 ⁷	+	+	0.211	92.189
5	2 ⁹	+	+	0.157	93.929	45	2 ⁷	+	+	0.213	92.073
6	2 ⁷	+	+	0.193	92.537	46	2 ²	+	-	1.860	28.074
7	2 ⁸	+	+	0.161	93.774	47	2 ¹⁰	+	+	0.219	91.531
8	2 ¹⁰	+	+	0.189	92.691	48	2 ⁸	+	+	0.241	90.681
9	2 ¹⁰	+	+	0.191	92.614	49	2 ⁹	+	+	0.253	90.217
10	2 ¹⁰	+	+	0.176	93.194	50	2 ¹⁰	+	+	0.185	92.846
11	2 ⁸	+	+	0.170	93.426	51	2 ⁹	+	+	0.217	91.609
12	2 ⁸	+	+	0.209	91.918	52	2 ⁹	+	+	0.202	92.189
13	2 ⁹	+	+	0.200	92.266	53	-	-	-	1.967	23.937
14	2 ⁸	+	+	0.182	92.962	54	-	-	-	1.965	24.014
15	2 ¹⁰	+	+	0.159	93.852	55	2 ²	-	-	1.968	23.898
16	2 ⁸	+	+	0.165	93.619	56	2 ¹	-	-	2.312	10.596
17	2 ⁹	+	+	0.161	93.774	57	-	-	-	1.927	25.483
18	2 ⁸	+	+	0.188	92.730	58	-	-	-	1.905	26.334
19	2 ¹¹	+	+	0.198	92.343	59	-	-	-	1.969	23.859
20	2 ¹⁰	+	+	0.194	92.498	60	-	-	-	2.047	20.843
21	2 ¹⁰	+	+	0.184	92.885	61	-	-	-	1.951	24.555
22	2 ⁷	+	+	0.155	100.000	62	-	-	-	1.965	24.014
23	2 ⁸	+	+	0.219	100.000	63	-	-	-	1.973	23.705
24	2 ⁸	+	+	0.247	100.000	64	-	-	-	1.874	27.533
25	2 ¹¹	+	+	0.220	91.531	65	-	-	-	1.870	27.68
26	2 ⁷	+	+	0.229	90.449	66	-	-	-	1.993	22.931
27	2 ⁹	+	+	0.198	91.493	67	-	-	-	1.983	10.363
28	2 ⁷	+	+	0.233	91.145	68	2 ¹	-	-	2.412	3.403
29	2 ⁸	+	+	0.222	92.343	69	-	-	-	2.347	23.318
30	2 ¹⁰	+	+	0.221	90.990	70	2 ³	+	-	1.795	6.729
31	2 ⁸	+	+	0.213	91.415	71	-	-	-	2.362	6.729
32	2 ⁹	+	+	0.217	91.454	72	-	-	-	2.531	9.242
33	2 ⁸	+	+	0.206	91.763	73	-	-	-	2.498	18.175
34	2 ¹⁰	+	+	0.233	91.609	74	-	-	-	2.651	8.662
35	2 ⁹	+	+	0.192	92.034	75	2 ⁷	+	-	2.393	2.127
36	2 ⁸	+	+	0.206	90.990	76	2 ¹	+	-	2.116	5.684
37	2 ⁸	+	+	0.225	92.575	77	-	-	-	2.573	-2.514
38	2 ¹¹	+	+	0.219	92.034	78	-	-	-	2.318	7.463
39	2 ⁷	+	+	0.412	91.299	79	-	-	-	2.498	18.175
40	2 ¹⁰	+	+	0.207	91.531	80	-	-	-	2.523	0.503

Positivo +

Negativo -

TA título de anticuerpos

21

Al establecer la comparación entre la Microseroneutralización ligada a la Enzima Peroxidasa y la prueba, ELISA (Tabla No. 5) se determinó una sensibilidad del 92% y un 100% de especificidad para la prueba de ELISA al registrarse 51 sueros positivos, 25 sueros negativos y 4 sueros falsos negativos (Tabla No. 6). Los títulos de anticuerpos que se obtuvieron en la prueba de MSLP para los sueros falsos positivos fueron: 2 sueros con título 2^2 , 1 suero con título 2^3 y 1 suero con título 2^7 .

TABLA NO. 6. DATOS OBTENIDOS PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE ELISA

	ELISA		
	POSITIVOS	NEGATIVOS	
MSLEP			
POSITIVOS	51	0	51
NEGATIVOS	4	25	29
TOTALES	55	25	80

SENSIBILIDAD:	$A / (A+C) \times 100$ $51 / 55 \times 100 = 92\%$	VALOR PREDICTIVO POSITIVO	$A / A+B \times 100$ $51/51 \times 100 = 100\%$
ESPECIFICIDAD	$(D / (D+B)) \times 100$ $25 / 25 \times 100 = 100\%$	VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	$D / C+D \times 100$ $25/29 \times 100 = 86.2\%$

En donde:

A = Verdaderos positivos

B = Falsos positivos

C = Falsos Negativos

D = Verdaderos Negativos

Al realizar la estadística de Kappa para obtener la concordancia entre MSLEP y la prueba de ELISA se obtuvo un valor de 0.88 en donde el número de acuerdos encontrados fue del 95% y el número de acuerdos por azar fue del 55%. (Tabla No.7)

TABLA No. 7 PRUEBA DE KAPPA DE CONCORDANCIA ENTRE LA PRUEBA DE MICROSERONEUTRALIZACION LIGADA A LA ENZIMA PEROXIDASA Y LA PRUEBA DE ELISA

	ELISA	
	POSITIVOS	NEGATIVOS
MSLEP		
POSITIVOS	51X55/80 = 35	
NEGATIVOS		29X25/80 = 9
TOTALES		

$$\text{Kappa} = \frac{\text{No. De acuerdos encontrados} - \text{No. De acuerdos por azar}}{100\% - \text{No. De acuerdos por azar}}$$

En donde:

$$\text{No. De Acuerdos encontrados} = \frac{A + D}{A + B + C + D}$$

$$\text{No del Acuerdos al azar} = \frac{\text{encontrados en A} + \text{encontrados en D}}{A + B + C + D}$$

$$\text{Encontrados en A} = \frac{(A + B) \times (A + C)}{A + B + C + D}$$

$$\text{Encontrados en D} = \frac{(C + D) \times (B + D)}{A + B + C + D}$$

$$\text{Kappa} = \frac{95\% - 55\%}{100\% - 55\%} = \frac{40\%}{45\%} = 0.88 \text{ de concordancia}$$

Los datos obtenidos en los sueros considerados para determinar sensibilidad y especificidad de la prueba de Inmunoperoxidasa se registran en la Tabla No. 5. Al desarrollar la tabla de 2X2 se determinó una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100% al registrarse 55 sueros positivos, 24 sueros negativos y 1 falso negativo el cual registró un título de anticuerpos en la prueba de MSLEP de 2^2 (Tabla No. 8). Al establecer la prueba estadística de Kappa se determinó una concordancia de 0.95 entre la MSLEP e Inmunoperoxidasa, registrándose el 98% de acuerdos encontrados y un 52% de acuerdos al azar (Tabla No. 9)

TABLA No. 8. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA

	INMUNOPEROXIDASA		
	POSITIVOS	NEGATIVOS	
MSLEP			
POSITIVOS	55	0	55
NEGATIVOS	1	24	25
TOTALES	56	24	80

SENSIBILIDAD:	$A / (A+C) \times 100$ $55 / 56 \times 100 = 98\%$	VALOR PREDICTIVO POSITIVO	$A / A+B \times 100$ $55/55 \times 100 = 100\%$
(ESPECIFICIDAD)	$(D / (D+B)) \times 100$ $24 / 24 \times 100 = 100\%$	VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	$D / C+D \times 100$ $24/25 \times 100 = 96\%$

En donde:

A = Verdaderos positivos

B = Falsos positivos

C = Falsos Negativos

D = Verdaderos Negativos

TABLA No. 9 PRUEBA KAPPA DE CONCORDANCIA ENTRE LA PRUEBA DE MICROSERONEUTRALIZACION LIGADA A LA ENZIMA PEROXIDASA Y LA PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA

	INMUNOPEROXIDASA	
	POSITIVOS	NEGATIVOS
MSLEP		
POSITIVOS	55X56/80 = 38	
NEGATIVOS		25X24/80 = 7
TOTALES		

Kappa= $\frac{\text{No. De acuerdos encontrados} - \text{No. De acuerdos por azar}}{100\% - \text{No. De acuerdos por azar}}$

En donde:

$$\text{No. De Acuerdos encontrados} = \frac{A + D}{A + B + C + D}$$

$$\text{No del Acuerdos al azar} = \frac{\text{encontrados en A} + \text{encontrados en D}}{A + B + C + D}$$

$$\text{Encontrados en A} = \frac{(A + B)}{A + B + C + D} \times \frac{(A + C)}{A + B + C + D}$$

$$\text{Encontrados en D} = \frac{(C + D)}{A + B + C + D} \times \frac{(B + D)}{A + B + C + D}$$

$$\text{Kappa} = \frac{98\% - 52\%}{100\% - 52\%} = \frac{46}{48} = 0.95$$

DISCUSIÓN

Las cepas de baja virulencia de Fiebre Porcina Clásica (FPC), ocasionan que la enfermedad se presente en forma subaguda, crónica o inaparente siendo la detección de anticuerpos contra el VFPC el único camino para evidenciar una infección.

Este hecho ha motivado el desarrollo de métodos serológicos cuantitativos y cualitativos que faciliten los estudios sobre las respuestas del hospedero ante una infección viral.

Una de las primera pruebas implementadas es la Precipitación en Agar gel (Pirtle 1965) sin embargo los resultados obtenidos en ésta técnica son limitados ya que esta prueba no detecta niveles bajos de anticuerpos, situación que ocurre en cerdas gestantes con infección crónica, en donde el virus no afecta a la cerda pero si a los fetos los cuales mueren al nacer o si solo resultan infectados congénitamente pueden nacer aparentemente saludables y muchos de ellos son inmunotolerantes. La prueba modificada de Fijación de complemento (Eskildsen and Overy, 1976), la prueba de Hemoaglutinación Pasiva (Labadie et al., 1977), La técnica de Inmunofluorescencia indirecta (Resseng and Den Boer, 1969), y la prueba de inmunolectro-osmoforesis (Terpstra, 1978), no realizan la diferenciación entre anticuerpos contra el VFPC y el los anticuerpos contra VDVB y siempre los resultados tenían que ser confirmados por la prueba de seroneutralización. Debido a la característica no cito patogénica de VFPC, las pruebas de neutralización se han aplicado utilizando la inmunofluorescencia en los metodos de reducción en microplaca (Ressang and Van Bekkum 1972), y Cultivos celulares cámaras (Liess et al 1976) o los métodos de interferencia viral o Exaltación de la Enfermedad de Newcastle(Kimagai 1964). Sin embargo la pruebas de neutralización son laboriosas y para una gran cantidad de muestras no es recomendable.

En 1981 Holm Jensen desarrolla una prueba de neutralización ligada a la enzima peroxidasa en donde realiza una comparación con la prueba de fijación de complemento y reporta que hay mayor sensibilidad en al prueba de microseroneutralización ligada a la peroxidasa que en fijación de complemento principalmente en infecciones tempranas. En 1984 Terpstra et. al. Describe una modificación a ésta técnica en donde reporta que la prueba tiene alta sensibilidad y detecta anticuerpos de 2-3 semanas post-infección.

La Microseroneutralización Ligada a la Enzima Peroxidasa (MSLEP) es una modificación de estos trabajos en donde se utiliza Proteína G conjugada con peroxidasa.

Para la implementación de ésta técnica se estandarizaron tiempos de incubación y metodologías, para garantizar que los resultados en futuros ensayos fueran consistentes y exactos. En los tres ensayos que se realizaron para determinar la repetibilidad de la prueba se mantuvieron las serologías negativas y positivas del grupo piloto y solo se presentan variaciones en los sueros positivos, con respecto al título de anticuerpos registrándose una dilución mayor o menor, los sueros negativos siempre registraron el mismo resultado. En el manual de la OIE se establece que la repetibilidad de una prueba diagnóstica para enfermedades infecciosas (OIE 1996) debe tener un coeficiente de variación menor al 15% en cual en el presente trabajo se cumple ya que se registró un coeficiente de variación del 6.5%.

La sensibilidad obtenida para la MSLEP fue del 98%, sensibilidad del 100% y la concordancia con la prueba de oro fue de 0.95 valor considerado como satisfactorio (27), y coincidiendo con lo reportado por Holm Jensen 1981 y Terpstra en 1984.

La prueba de Microseroneutralización Ligada a la enzima peroxidasa tiene una adecuada sensibilidad y especificidad luego de su estandarización puede considerarse como una herramienta más para el diagnóstico serológico de la FPC, este método permite valorar la capacidad que tiene un suero determinado para reconocer un antígeno específico y su capacidad para neutralizar la actividad biológica de éste. Además se logró reducir costos de material, reactivos, equipo y personal al compararse con la técnica de Seroneutralización en cultivo de tejidos (SCTIV) la cual es considerada como la prueba de oro o referencia para cualquier valoración serológica. (Cuadro No. 10). Por ejemplo para realizar el análisis de 40 sueros se reduce el uso de 540 tubos para cultivo celular para la prueba SCTIV, por 6 microplacas de 96 pozos empleadas en la MSLEP, 300 ml de suspensión celular de cultivo primario utilizada en SCTIV por 60 ml de suspensión de línea celular, y el tiempo de emisión de resultados de 7-9 días por 2-3 días. Además la MSLEP facilita la realización de la lectura ya que ésta se puede realizar a simple vista y las microplacas pueden mantenerse por más tiempo sin que la lectura se modifique ya que las células están fijadas y la reacción enzimática se conserva.

Con respecto a la comparación realizada con la prueba de ELISA, se obtuvo una sensibilidad del 92%. El virus de la FPC se encuentra estrechamente relacionado, tanto antigénica como genéticamente con otros dos virus integrantes del mismo género de los pestivirus, el virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) y el de la Enfermedad de las fronteras (9.13,14). El grado de reactividad cruzada depende de la cepa del virus de Diarrea Viral Bovina de que se trate, del intervalo transcurrido entre la infección y el momento de la toma de muestras y de la cepa del virus de FPC. Los elevados niveles de anticuerpos que se alcanzan tras una infección de FPC, incluso en el caso de exposición a cepas poco virulentas, posibilitan el empleo de diluciones iniciales relativamente altas en las prueba de MSLEP lo cual permite evitar la mayoría de reacciones cruzadas (40,41). Además el uso de anticuerpos monoclonales específicos permite la diferenciación entre estos virus.

La especificidad de la prueba de ELISA fue de un 100%. La concordancia entre la MSLEP y la prueba de ELISA fue de un 0.88 considerándose como satisfactoria (27).

Con respecto a la prueba de Inmunoperoxidasa se obtuvo un 98% de especificidad y un 100% de sensibilidad y una concordancia con la prueba de MSLEP del 0.96.

La especificidad para la prueba de MSLEP, Inmunoperoxidasa y ELISA fue del 100% en todos los casos.

TABLA NO. 10 COMPARATIVO ENTRE LA PRUEBA DE MSLEP Y LA SCTIV. PARA EL ANALISIS DE 40 SUEROS

	SCTIV	MSLEP
MATERIAL	<ul style="list-style-type: none"> • 540 tubos para cultivo celular • 9 gradillas para tubos de cultivo con capacidad para 60 tubos • 2 gradillas para sistema rotatorio con capacidad para 300 tubos • 1048 tapones para tubos No. 1 	<ul style="list-style-type: none"> • 6 microplacas fondo plano para cultivo celular
BIOLOGICOS Y REACTIVOS	<ul style="list-style-type: none"> • 300 ml suspensión celular de cultivo primario de testículo de cerdo • 400 ml de medio de dilución • Virus FPC y VSV 	<ul style="list-style-type: none"> • 60 ml de suspensión celular de la línea ST • 120 ml de medio de dilución • 180 ml PBS 0.01 m • Acetona 30% 60 ml • 200 ml solución de lavado • 30 ml Proteína G conjugada con peroxidasa (1:500) • Sustrato-Cromógeno 30 microlitros
INTERPRETACION	<ul style="list-style-type: none"> • Necesariamente el uso de microscopio óptico 	<ul style="list-style-type: none"> • lectura a simple vista y si existe sospecha el uso de microscopio.
TIEMPO DE DURACION	<ul style="list-style-type: none"> • 7 – 9 días 	<ul style="list-style-type: none"> • 2-3 días

C O N C L U S I O N E S

La prueba de Microseroneutralización Ligada a la Enzima Peroxidasa (MSLEP) para detectar niveles de anticuerpos contra la Fiebre Porcina Clásica, puede considerarse como una alternativa para el diagnóstico de ésta enfermedad ya que presenta una repetibilidad con un coeficiente de variación del 6.5%, una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%; valores que garantizan resultados confiables ya que se estandarizaron tiempos y metodologías.

La MSLEP al igual que la prueba de Seroneutralización en cultivo de tejido (SCTIV), detecta el total de anticuerpos neutralizantes, estableciéndose una gran correlación entre la respuesta "in vivo" y la respuesta "in vitro".

Se optimizaron los tiempos, materiales, biológicos, reactivos y personal, para el diagnóstico serológico de la Fiebre Porcina Clásica.

Para descartar reacciones cruzadas con el virus de diarrea viral bovina en la literatura se recomienda iniciar con una dilución 1:10.

Al realizar la comparación con la prueba de ELISA e Inmunoperoxidasa se obtuvo una concordancia del 0.88 y 0.95 respectivamente la cual es considerada como satisfactoria.

Esta prueba fue implementada para otros diagnósticos serológicos de enfermedades virales en animales.

ANEXO 1

RELACION DE EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS UTILIZADOS

EQUIPO

- Estufa Bacteriológica con temperatura de 37°C y suministro de 5% CO₂ y 70% humedad.
- Baño maría
- Micropipeta multicanal con capacidad de 50 a 200 µl
- Micropipeta unicanal con capacidad de 5 a 50 µl
- Microscopio óptico con luz invertida
- Esterilizador de luz ultravioleta
- Congelador de -20°C
- Refrigerador
- Horno 70 – 80°C
- Lector de ELISA
- Cuarto estufa con sistema rotatorio para tubos de cultivo

MATERIAL

- Gradillas metálicas para tubos de cultivo celular de 13 X 100 mm
- Frascos de cristal de 100,250 y 500 ml
- Microplacas de poliestireno fondo plano para cultivo celular de 96 pozos*
- Microplacas de fondo plano no tratadas para cultivo celular**
- Contenedor de líquidos de 100 ml
- Pipetas serológicas de 1, 5, 10 y 25 ml
- Puntas para micropipetas
- Tubos de vidrio para cultivo celular de 13 x 100 mm
- Gradillas para tubo de cultivo
- Gradillas para sistema rotatorio
- Jeringa automática de 0.5 a 2 ml

*Corning Inc. Cat. 3596, Corning N.Y.

**Corning Inc. Cat. 3370, Corning N.Y.

BIOLOGICOS Y REACTIVOS

- Suero fetal bovino o suero de cabra (Cansera cat. CD8-500)
(Libre de anticuerpos contra FPC y DVB)
- Suero control positivo a anticuerpos contra el VFPC
(Elaborado en el CENSA)
- Suero control negativo a anticuerpos contra el VFPC
(Elaborado en el CENSA)
- Suero hiperinmune monoespecífico al VFPC con título 1:300 – 1: 500
(Elaborado en el CENASA en especie homóloga)
- Virus de Fiebre Porcina Clásica cepa E⁻
- Virus de Estomatitis Vesicular
- Línea celular de testículo de cerdo (ST)
- Cultivo primario de células de testículo de cerdo
- *Proteína G conjugada con peroxidasa (Cat. P-8170) dilución 1/500
- *3amino – 9 etil carbozol (Sigma Cat. A 69926)
- *Peróxido de hidrógeno al 30% (Sigma H -1009)

BIVE IP KIT FPC. Productora Nal. De Biológicos Veterinarios, Zaragoza No. 75, México, D.F.

A P E N D I C E I

SOLUCION DE EAGLE

Agua destilada estéril	1000	ml
Medio Mínimo Esencial Eagle (MEM) Gibco. BRL	9.60	g
Caldo triptosa fosfato Difco	2.97	g
Esterilizar a 121 °C por 20 minutos o por filtración con membrana de 220 nm de diámetro de poro y almacenar en refrigeración		

SOLUCION STOCK DE L-GLUTAMINA

L glutamina (Sigma, cristales)	29.29	g
Agua destilada estéril	1000	ml
Esterilizar por filtración con membrana de 220 nm y conservar a menos 20 °C		

SOLUCION STOCK DE BICARBONATO DE SODIO AL 7%

NaHCO ₃ (Productos Quim. Monterrey, en polvo)	70	g
Agua destilada	1000	ml
Esterilizar por filtración con membrana de 220 nm y conservar a 4 °C		

SOLUCION STOCK DE ANTIBIÓTICOS

Solución de Eagle	1000	ml
Estreptomina (Lab. Brovel SA. De C.V.	10	g
Penicilina G potásica (Sigma Cat. P. 7794)	10 000 000	U.I.

Esterilizar por filtración con membrana de 220 y conservar a menos 20 °C

A P E N D I C E II

MEDIO DE CRECIMIENTO (solución de trabajo)

L- glutamina sol. stock	10	ml
Antibiótico sol. stock	20	ml
Bicarbonato de sodio al 7%	20	ml
Suero fetal bovino	100	ml
MEM	850	ml

MEDIO DE DILUCIÓN

L-Glutamina sol.stock	10	ml
Antibióticos sol. stock	20	ml
Bicarbonato de sodio al 7%	20	ml
MEM	950	ml

PBS 0.01 M

NaCl (Acros Cat. 42429-500)	80	g
KCl (Merck Art. 4936)	2	g
Na ₂ HPO ₄ (Acros, Car. 42437-500)	11.5	g
KH ₂ PO ₄ (Baker Cat. 3246-20)	2	g
Agua destilada	10	l
Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos		

ACETONA AL 30% PARA FIJAR CELULAS

PBS 0.01 M	700	ml
Acetona pura (Acros organics 410-5000)	300	ml
Albúmina sérica bovina (Fracción V)	0.2	g

A P E N D I C E III

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS PARA DILUCIÓN SAF D

NaCl	21	g
KCl	0.745	g
Fosfato de Sodio Monobásico	1.38	g
Fosfato de sodio dibásico	1.741	g
Tween 20	5	ml
Agua destilada	1	l

SOLUCION DE LAVADO (SAF - L)

NaCl	23.20	g
KCl	29.80	g
Fosfato de Sodio Monobásico	55.20	g
Fosfato de sodio dibásico	69.64	g
Tween 20	10	ml
Agua destilada		

SOLUCIONES PARA EL SUSTRATO

Solución A Stock

Fosfato de sodio	28.4	g
Timerosal al 11%	1	ml
Agua destilada	1000	ml

Solución B stock

Acido cítrico	19.2	g
Agua destilada	1000	ml

Indicador de Peroxidasa

3 amino-9etil-carbazol	5	g
Alcohol etílico	25	ml
Tween 20	75	ml

A P E N D I C E IV

SUSTRATO-CROMOGENO

Kit de inmunoperoxidasa PRONABIVE

Solución A stock	15	ml
Solución B stock	15	ml
Indicador de peroxidasa	0.2	ml
Sustrato H ₂ O ₂ 30%	20	μl

BIBLIOGRAFIA

1. Alcantar Alejandro (1996) Métodos Estadísticos en Bioensayos. Instituto Mexicano de Capacitación de la Industria Farmacéutica y Químico Farmacéutica. México, DF:
2. Arias, M., Sánchez Vizcaíno, JM (1999) La Inmunología porcina. Su importancia como base del diagnóstico y el diseño de vacunas. Anaporc 188, 72-86.
3. Afshar A et al (1989) Application of peroxidase labeled antibody assay for detection of porcine IgG to hog cholera and bovine viral diarrhea viruses J. Virol Methods 23(3):253
4. Ballinas, A.(1991) Cólera Porcino, estudios recapitulativos. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México, DF.
5. Bouma A, et al. (2001) Evaluation of diagnostic test for the detection of classical swine fever in the field without a gold standard. J. Vet Diagn Invest 2001 13(5): 383-8
6. Buonauoglia C. et al (1989) A rapid serum neutralization test in micro plates for the detection of antibodies to Hog Cholera virus J. Vir. Methods 23: 77-79
7. Cabrera T. A., (1992) La campaña para el control y erradicación de la Fiebre Porcina Clásica en México. En las Memorias del: Symposium sobre Enfermedades del cerdo con implicaciones en el comercio internacional. Ciudad Universitaria, México
8. Carbrey, E. A. (1986) Cólera Porcino. En: Enfermedades Exóticas de la Asociación de Sanidad Animal de los Estados Unidos. Publicado por Comisión México-Americana para la prevención de la Fiebre Aftosa. México.
9. Correa G. (1981) Cólera Porcino. En: Enfermedades Virales de los Animales Domésticos monogástricos. Vol.1, 4^a. Ed., Editorial FH.
10. Ducatelle R., Coussemente, W. and, Hoorens, J. :Inmunoperoxidase study of Aujeszky´s disease in pigs. Res. V. Sci. 32:294-302.(1982)
11. Francki, R:l: et al (1991) Classification and Nomenclature of virus. Fifth Report of the International Committee on the taxonomy of viruses. Archives of Virology, supplementing 2: 223-233.
12. Holm Jensen(1981). Detection of antibodies against Hog Cholera virus and Vobine Viral Diarrhea virus in porcine serum. Acta vet.scand. 22 : 85-90
13. Howard, C. (1981).New developments in practical virology, Alan R Liss, New York: 59-81
14. Jacobson, R. (1996) Validation of diagnostic assays for infectious disease in Office International of Epizooties (OIE) Manual. Amendment

15. Justin, D. (1990) The immunoperoxidase test as a rapid screening method for detection of antibodies to Hog chore virus. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Abstracts 22nd Annual Meeting. Denver, Colorado. Lin. T et al: Evaluation of the fluorescent antibody cell culture test for detection and titration of hog chore virus. Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.: 9: 10-19 (1969)
16. Lowing, J:P: (1994) Classical Swine Fever genetic detection and analysis of differences between virus isolates Journal of General Virology 1994 75
17. Malacara, J.: Bases para la investigación biomédica. Distribuidora y Editorial Mexicana. 51-65 (1987)
18. Manual OIE Amendment 1, January (1996)
19. Margni, R.: Inmunología e Inmunoquímica. Ed. Médica Panamericana. S. A. Buenos Aires. 571-586 (1990), Buenos Aires, Argentina.
20. Melendez, L. et al.: Manual of rapid diagnosis of animal virus diseases by enzyme immunoassay methods. Inter American Institute for Cooperation on Agriculture, Scientific Publication No. 15 (1987) San José, Costa Rica.
21. Méndez, I. et al: El protocolo de investigación. Lineamientos para su elaboración y análisis 11-117. Ed. Trillas. (1987) México.
22. Merethe, H. ,(1991): Detection of antibodies against Hog Cholera virus and Bovine Viral Diarrhea in porcine serum. Acta Vet. Scand. 22:85-98
23. Merino, J y Martínez: Métodos rápidos de inmunoperoxidasa para el diagnóstico de enfermedades virales. Re. Salud Anim. 10:357-361 (1988)
24. Morilla, G.: Control y erradicación de la Fiebre Porcina Clásica. Ciencia Veterinaria 6:173-200(1994) México, DF.
25. Morilla, G.: Introducción a las pruebas de inmunodiagnóstico. En: Manual de Inmunología, 1ª. Ed. Diana, México (1986)
26. Morilla G (1998) Introducción al Diagnóstico Inmunológico de la Enfermedades de los Animales Domésticos, INIFAP-SAGAR. México.
27. Morilla G(2000) La Fiebre Porcina Clásica en las Américas Simposium Internacional Puebla 1998.México.
28. Moser C. et al (1996) Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glucoprotein E2 Vet Microbiol July; 51 (1-2) : 41-53.
29. Nakamura, R.M., A. And Bidwell, D.E.: Enzyme immunoassays; heterogeneous and homogeneous systems in; Handbook of experimental immunology Vol., I; Inmunochemistry. Edited by Blackwell Scientific Publications (1986)
30. Nielsen K.H. et al. (1996) Immunoassay development application to enzyme immunoassay for the diagnosis of Brucellosis Animal Diseases Research Institute Agriculture and Agro-Food Canada
31. Office International of Epizooties (OIE) Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biological products. Vol. II (1990)
32. Office International of Epizooties (OIE) Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, Paris, France 2000.
33. Paton, D.: Pestivirus diversity: J. comp. Path. 112-215 236. (1995)

34. Pearson JE (1992) Hog cholera diagnostic techniques *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1992 Jul ; 15(3)
35. Ronald D Smith (1995) *Veterinary Clinical Epidemiology* 2a. Ed. CRC Press USA
36. Ruggli, N., et al (1996) Nucleotide sequence of Classical swine fever virus strain Alford 187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full length C DNA *J. Virol.* 70(6) 3478-3487.
37. Sally, J: *Immunochemical staining methods*. Dakao Corporation (1995) California U.S.A.
38. Sánchez Vizcaíno JM. (1987) *Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal*. Office International des epizooties. Serie Técnicas No. 7
39. Terpstra C., Bloemraad, M and Gielkens, A.: The neutralizing peroxidase linked assay for detection of antibody against Swine Fever Virus. *Vet Microbiol.* 9: 113-120. (1984)
40. Terpstra C and Wensvoort G (1988) The protective value of vaccine-induced neutralizing antibody titers in swine fever. *Vet. Microbiol.*, 16, 123-128.
41. Thiel, H:J: et al (1991) Hog Cholera virus molecular composition of virions from a pestivirus. *Journal of Virology* 65(9)
42. Tizar, Ia. (1998) *Inmunología Veterinaria*. Mc Graw-Hill Interamericana. Healthcare Group. México.
43. Van Rijn, P. et al (1997) Subdivision of the Pestivirus Genus Based on envelope glycoprotein E2. *Virology* 237, 337-348,
44. Wayne, W: *Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud*. Ed. Noriega Limusa. |98-203 (1991)
45. Weiland, E., et al (1992) A second envelope glycoprotein mediate neutralization pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.* 66,3677-3682.
46. Weir D.M. et al (1980) *Immunochestry* Blackwell Scientific Publications *Hand-book of experimental Immunology*.
47. Wensvoort, G., Bloemradd M. and Terptra C: An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to Classical Swine Fever Virus. *Vet Microbiol.* 17 (1988)
48. Welter, M et. al : Adaptation an serial passage of porcine group C rotavirus in ST-Cells, an established diploid testicular cell line. *Arch. Virol.* 120:297-304 (1991)

